

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
8. November 2001 (08.11.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/84140 A2

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: **G01N 33/487**

6, 31319 Sehnde OT Müllingen (DE). **HALLER, Her-**
mann [DE/DE]; An der Trift 8 a, 30559 Hannover (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: **PCT/DE01/01691**

(22) Internationales Anmeldedatum:
4. Mai 2001 (04.05.2001)

(74) **Anwalt: THÖMEN & KÖRNER**; Zeppelinstrasse 5,
30175 Hannover (DE).

(25) Einreichungssprache: **Deutsch**

(81) **Bestimmungsstaaten (national):** JP, US.

(26) Veröffentlichungssprache: **Deutsch**

(84) **Bestimmungsstaaten (regional):** europäisches Patent (AT,
BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC,
NL, PT, SE, TR).

(30) Angaben zur Priorität:
100 21 737.0 4. Mai 2000 (04.05.2000) **DE**

Veröffentlicht:

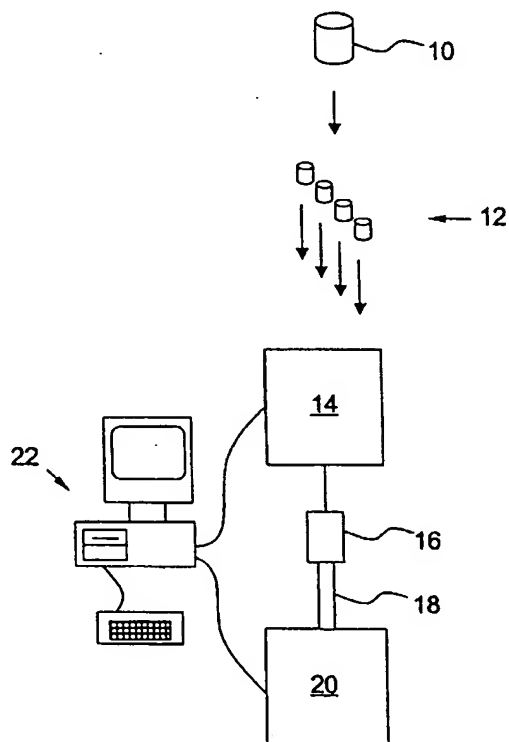
(71) **Anmelder und**
(72) **Erfinder: MISCHAK, Harald** [DE/DE]; Storchenstrasse

— *ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu
veröffentlichen nach Erhalt des Berichts*

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) **Title:** METHOD AND DEVICE FOR THE QUALITATIVE AND/OR QUANTITATIVE ANALYSIS OF A PROTEIN
AND/OR PEPTIDE PATTERN OF A LIQUID SAMPLE THAT IS DERIVED FROM THE HUMAN OR ANIMAL BODY

(54) **Bezeichnung:** VERFAHREN UND VORRICHTUNG ZUR QUALITATIVEN UND/ODER QUANTITATIVEN BESTIM-
MUNG EINES PROTEIN- UND/ODER PEPTIDMUSTERS EINER FLÜSSIGKEITSPROBE, DIE DEM MENSCHLICHEN
ODER TIERISCHEN KÖRPER ENTNOMMEN WIRD



(57) **Abstract:** The invention relates to a method for the qual-
itative and/or quantitative analysis of a protein and/or peptide
pattern of a liquid sample that is derived from the human or an-
imal body. The proteins and peptides of the liquid sample are
separated by capillary electrophoresis, then directly ionized and
transferred for analysis online via an interface to a mass spec-
trometer coupled thereto.

(57) **Zusammenfassung:** Die Erfindung betrifft ein Verfahren
zur qualitativen und/oder quantitativen Bestimmung eines Pro-
tein- und/oder Peptidmusters einer Flüssigkeitsprobe, die dem
menschlichen oder tierischen Körper entnommen wird. Die Pro-
teine und Peptide der Flüssigkeitsprobe werden mittels Kapillar-
elektrophorese getrennt, anschließend direkt ionisiert und online
über ein Interface in ein daran gekoppeltes Massenspektrometer
zur Detektion überführt.

WO 01/84140 A2



Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

Verfahren und Vorrichtung zur qualitativen und/oder quantitativen Bestimmung eines Protein- und/oder Peptidmusters einer Flüssigkeitsprobe, die dem menschlichen oder tierischen Körper entnommen wird

Die Erfindung betrifft ein Verfahren nach dem Oberbegriff des Anspruchs 1 und eine Vorrichtung nach dem Oberbegriff des Anspruchs 8.

Die Funktionen des menschlichen und tierischen Organismus unterliegen einer sehr komplexen und exakten Steuerung. Diese erfolgt unter anderen mittels Proteinen und Peptiden über das Serum.

Eine entscheidende Rolle spielen dabei die Cytokine. Dies sind Polypeptide, die von Zellen in das Blut oder das umgebende Gewebe ausgeschieden werden und nach Bindung an spezifischen Rezeptoren Funktionen wie Teilung, Wachstum oder Fortbewegung anderer Zellen beeinflussen. Cytokine regulieren unter anderen das komplizierte Wechselspiel der Zellen des Immunsystems.

Zu den Cytokinen gehören auch die sogenannten Interleukine. Dies sind Mediator-Stoffe des Immunsystems, die von Leukocyten in geringen Konzentrationen produziert werden und auf

- 2 -

Wachstum, Differenzierung und Aktivität von Zellen des Immun-system Einfluß nehmen.

Um die Funktionen und den Zustand eines menschlichen oder tierischen Körpers zu erfassen, ist die qualitative und/oder quantitative Bestimmung der Proteine und/oder Peptide einer Flüssigkeitsprobe, die dem menschlichen oder tierischen Körper entnommen wird, erforderlich.

Zur qualitativen und/oder quantitativen Bestimmung einzelner Proteine oder Peptide in Flüssigkeitsproben, die dem menschlichen oder tierischen Körper entnommen werden, ist die Verwendung von Enzymimmunoassays bekannt. Prinzipiell ist hier eine Antigen-Antikörper-Reaktion an eine enzymatische Reaktion gekoppelt, wobei entweder Antikörper-Enzym-Konjugate oder Antigen-Enzym-Konjugate verwendet werden, die nach Zugabe von geeignetem Substrat durch die Messung der Enzym-Aktivität des Konjugats bestimmt werden.

Im allgemeinen bedient man sich der Festphasen-Technik des ELISA (enzyme linked immunosorbent assay), wo das Antigen entweder durch direkte Adsorption oder über einen weiteren Antikörper an die feste Phase gebunden wird.

Einige der Proteine und Peptide werden im Rahmen der heutigen medizinisch-klinischen Untersuchungen schon qualitativ und/oder quantitativ ermittelt.

Eine genaue Kenntnis der Proteine und Peptide sowie deren Konzentration in Flüssigkeitsproben, insbesondere im Serum,

- 3 -

gewinnt im Rahmen medizinisch-klinischer Untersuchungen zunehmend an Bedeutung.

Es hat sich herausgestellt, daß der Zustand eines menschlichen oder tierischen Körpers unter Heranziehung des Protein- und/oder Peptidmusters relativ gut beschrieben werden kann.

Nachteilig an der bisher verwendeten Methode des ELISA ist jedoch, daß immer nur ein Protein oder Peptid bestimmt werden kann. Um ein möglichst vollständiges Protein- und/oder Peptidmuster zu erhalten, müssen daher eine Vielzahl von Proteinen und/oder Peptiden einzeln bestimmt werden.

Viele Proteine oder Peptide sind außerdem nicht bestimmbar, da keine zur Detektion erforderlichen Reagenzien, beispielsweise spezifische Antikörper, zur Verfügung stehen.

Aufgrund der geringen Anzahl von Messungen ist es dann mitunter schwierig, aussagekräftige Schlußfolgerungen über den Zustand eines menschlichen oder tierischen Körpers zu ziehen.

Insbesondere stehen die Ergebnisse der medizinisch-klinischen Untersuchungen erst Stunden nach Entnahme der Flüssigkeitsprobe zur Verfügung, so daß keine zeitnahen Aussagen über den Zustand des menschlichen oder tierischen Körpers möglich sind.

Mit der Methode des ELISA ist es daher nicht möglich, schnell ein umfassendes und damit aussagekräftiges Protein- und/oder Peptidmuster zu erstellen.

- 4 -

Nachteilig an der Methode des ELISA ist weiterhin, daß zur Bestimmung der Konzentration einzelner Proteine oder Peptide in unbekannten Flüssigkeitsproben Vergleichsmessungen von Proben verschiedener bekannter Protein- oder Peptidkonzentrationen, sogenannte Standards, notwendig sind. Diese Messungen sind gleichermaßen zeit- und kostenintensiv, weil ebenfalls immer nur ein einzelnes Protein oder Peptid bestimmt werden kann.

Die zur Verfügung stehenden und zur Anwendung kommenden klassischen Analysenmethoden zur Bestimmung eines Protein- und/oder Peptidmusters einer Flüssigkeitsprobe, die dem menschlichen oder tierischen Körper entnommen wird, können daher nicht voll befriedigen.

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren zur qualitativen und/oder quantitativen Bestimmung eines Protein- und/oder Peptidmusters einer Flüssigkeitsprobe, die dem menschlichen oder tierischen Körper entnommen wird, und eine Vorrichtung zur Durchführung und Auswertung des Verfahrens bereitzustellen, die eine vollständige und schnelle Bestimmung der Proteine und/oder Peptide ermöglicht.

Diese Aufgabe wird bei einem Verfahren mit den Merkmalen des Anspruchs 1 und bei einer Vorrichtung mit den Merkmalen des Anspruchs 8 gelöst. Weiterbildungen und vorteilhafte Ausgestaltungen ergeben sich aus den Unteransprüchen.

Das erfindungsgemäße Verfahren zur qualitativen und/oder quantitativen Bestimmung eines Protein- und/oder Peptidmusters einer Flüssigkeitsprobe, die dem menschlichen oder tierischen Körper entnommen wird, sieht vor, daß die Proteine und/oder Peptide der Flüssigkeitsprobe mittels Kapillarelektrophorese getrennt, anschließend direkt ionisiert und online über ein Interface in ein daran gekoppeltes Massenspektrometer zur Detektion überführt werden.

Eine zuverlässige qualitative und quantitative Bestimmung von Proteinen und/oder Peptiden in einer komplexen Matrix, wie sie die menschliche oder tierische Körperflüssigkeit darstellt, erfordert zunächst den Einsatz einer Methode zur Stofftrennung. Als geeignete Trennmethode hat sich hierbei die Kapillarelektrophorese erwiesen.

Das Trennprinzip der Elektrophorese besteht in dem unterschiedlichen Wanderungsverhalten elektrisch geladener Teilchen in Lösung beim Anlegen eines elektrischen Feldes. Der Vorteil der Kapillaren besteht in dem günstigen Verhältnis Oberfläche/Volumen, was einen guten Abtransport der beim Stromfluß entstehenden Jouleschen Wärme ermöglicht. Dies wiederum erlaubt das Anlegen hoher Spannungen (üblicherweise bis 30 kV) und damit eine hohe Trennleistung und kurze Analysenzeiten.

Die hohe Trennleistung ermöglicht die Bestimmung eines vollständigen Protein- und/oder Peptidmusters der Flüssigkeitsprobe. Die kurzen Analysenzeiten erlauben, zeitnahe Aussagen

- 6 -

über den Zustand des menschlichen oder tierischen Körper, dem die Flüssigkeitsprobe entnommen worden ist, zu machen.

Mit Hilfe der Kapillarelektrophorese ist es möglich, neutrale Moleküle, Kationen und Anionen zu trennen. Neutrale Teilchen wandern beim Anlegen eines Stroms mit der Geschwindigkeit des elektroosmotischen Flusses, Kationen werden zur Kathode beschleunigt und Anionen verzögert.

Zur Detektion der mittels Kapillarelektrophorese getrennten Proteine und/oder Peptide ist das Kapillarelektrophoresegerät an einen Massenspektrometer gekoppelt.

Die Massenspektrometrie erlaubt die Bestimmung der Molekülmasse freier Ionen im Hochvakuum. Es enthält einen Massenanalysator, der die Ionen nach ihrem Masse/Ladungs-Quotienten (m/z) auftrennt, und einen Detektor.

Weil die Ionisation unter Atmosphärendruck stattfindet, die Massenanalyse jedoch ein Hochvakuum erfordert, ist ein entsprechender Übergang, ein sogenanntes Interface, vorgesehen.

Mit der Massenspektrometrie ist es möglich, routinemäßig 10 fmol eines Peptids bzw. kleinen Proteins, also 0,1 ng eines 10 kDa Proteins, mit einer Massengenauigkeit von $\pm 0,01 \%$ aus einem komplexen Gemisch zu vermessen. Experimentell werden bereits noch weniger als 0,1 fmol vermessen.

Damit ist diese Methode vor allem dazu geeignet, komplexe Flüssigkeitsproben, die dem menschlichen oder tierischen Kör-

- 7 -

per entnommen werden, auf die Anwesenheit bestimmter Proteine und Peptide zu untersuchen.

Insbesondere ist vorgesehen, daß als Flüssigkeitsprobe Serum oder Urin verwendet wird.

Dabei handelt es sich um Flüssigkeitsproben, die dem menschlichen Körper entnommen werden und über eine Protein- und/oder Peptidzusammensetzung verfügen, die besonders gut geeignet sind, Aussagen über den Zustand des menschlichen oder tierischen Körpers zu machen.

Die massenspektrometrische Analyse besitzt gegenüber den derzeit gängigen Methoden den Vorteil, daß die Konzentration vieler (> 100) Peptide und Proteine einer Serum- oder Urinprobe mittels einer einzigen Analyse bestimmt werden kann. Außerdem können derzeit noch unbekannte Proteine oder Peptide, die den Zustand des menschlichen oder tierischen Körpers beschreiben, identifiziert werden.

Durch das erfindungsgemäße Verfahren wird erreicht, daß gegenüber den herkömmlichen Bestimmungsmethoden nur ein Arbeitsgang notwendig ist, um mehrere Proteine und/oder Peptide zu bestimmen. Das bedeutet Zeit- und Kostenersparnis.

Das erhaltene Massenspektrum kann zum einen als eine Art "Fingerprint" zur Beschreibung des Gesamtzustandes eines menschlichen oder tierischen Körpers herangezogen werden. Insbesondere können auch nur bestimmte Bereiche des Massenspektrums ausgewertet werden.

- 8 -

Zum anderen ist es aber auch möglich, die Proteine einzeln zu identifizieren und über ihre Anwesenheit, Nichtanwesenheit und ihre Konzentration Schlußfolgerungen über den Zustand des menschlichen oder tierischen Körpers zu ziehen.

Weiterhin ist vorgesehen, daß das Protein- und/oder Peptidmuster, wie z. B. das Muster der Cytokine, insbesondere der Interleukine, bestimmt wird.

Diese Proteine sind nach derzeitigem Wissen wesentlich, die Funktionen des menschlichen und tierischen Organismus steuernde Proteine.

Eine Weiterbildung sieht vor, daß die Flüssigkeitsprobe vor ihrer Trennung mittels Kapillarelektrophorese zunächst angesäuert wird, mittels Ultrazentrifugation von unerwünschten Partikeln gereinigt und/oder mittels Ultrafiltration in Fraktionen, die Proteine und/oder Peptide bestimmter molekularer Größe enthalten, aufgeteilt wird:

Nach dem Ansäuern, beispielsweise mit Ameisensäure auf einen pH-Wert 3, ist es möglich, die unerwünschten unlöslichen Probenbestandteile durch Ultrazentrifugation abzutrennen. Durch eine Fraktionierung der Flüssigkeitsprobe wird erreicht, daß beispielsweise nur Fraktionen von Proteinen und/oder Peptiden bestimmter Molekulargewichte untersucht werden, die zur Beschreibung des Zustandes eines menschlichen oder tierischen Körpers gerade benötigt werden.

- 9 -

Dazu ist vorgesehen, daß sich die Fraktionen aus Proteinen und/oder Peptiden der Molekulargewichten <3 kDa, 3-30 kDa, 30-50 kDa und >50 kDa zusammensetzen.

Sollen beispielsweise die zu der Gruppe der Cytokine gehörenden Interleukine, die hauptsächlich Glykoproteine mit Molekulargewichten von 17 kDa bis 26 kDa umfassen, bestimmt werden, so reicht es, die Fraktion aus Proteinen und/oder Peptiden der Molekulargewichte 3-30 kDa zu verwenden. Dies wiederum bedeutet eine Verkürzung der Analysenzeiten.

Weiterhin ist es möglich, daß die Proteine und/oder Peptide direkt nach ihrer Trennung, aber vor ihrer Ionisation detektiert werden.

Zur Detektion der mittels Kapillarelektrophorese getrennten Proteine und/oder Peptide sind bereits eine Reihe von Verfahren bekannt, die eine gute qualitative und quantitative Proteinanalytik aber nur in Ausnahmefällen ermöglichen.

Daher ist die vorgesehene Detektion nur in Verbindung mit der Massenspektrometrie zur genaueren Bestimmung der Proteine und/oder Peptide geeignet.

Eine vorteilhafte Ausgestaltung der Erfindung sieht vor, daß zur Ionisation der Proteine und/oder Peptide die Elektrospray-Ionisation verwendet wird.

Hierbei werden die in Lösung vorliegenden Moleküle unter anderem unter dem Einfluß einer Hochspannung (1-8 kV) ver-

- 10 -

sprüht, wobei sich zunächst kleine geladene Tröpfchen bilden, die durch Verdampfung des Lösungsmittels kleiner werden. Schließlich kommt es zur Bildung freier gasförmiger Ionen.

Die Elektrospray-Ionisation ist auf Grund der relativ geringen auf die Moleküle wirkenden Energien eine milde Ionisierungstechnik, so daß selbst empfindliche Moleküle und teilweise sogar nichtkovalente Aggregate unzersetzt in den Massenanalysator gelangen.

Vorteilhaft ist, daß bei der Elektrospray-Ionisation primär keine Molekülfragmente entstehen. Dadurch wird zwar die Aufklärung der Molekülstruktur erschwert, aber eine sehr gute Identifizierung der in der Flüssigkeitsprobe gelösten Proteine und/oder Peptide ermöglicht.

Die trotzdem bei der Ionisierung anfallenden Fragmente können bei kleineren Peptiden, beispielsweise bei Oligopeptiden mit weniger als 20 Aminosäuren, vorteilhaft zur Identifizierung der Aminosäuresequenz herangezogen werden.

Außerdem ist es möglich, daß als Massenspektrometer ein Flugzeitmassenspektrometer, ein sogenanntes TOF (von engl. time of flight) -Massenspektrometer, verwendet wird.

Bei einem TOF-Massenspektrometer wird eine bestimmte Beschleunigungsspannung angelegt, die den Ionen eine gleich große kinetische Energie verleiht. Dann wird sehr genau die Zeit gemessen, die die jeweiligen Ionen benötigen, um eine bestimmte Driftstrecke durch das Flugrohr zurückzulegen, da

- 11 -

bei gleicher kinetischer Energie die Geschwindigkeit der Ionen von ihrer Masse abhängt.

TOF-Massenspektrometer haben eine sehr hohe Scangeschwindigkeit und erreichen daher eine sehr gute Auflösung. Sie ermöglichen die vollständige Identifizierung der in der Flüssigkeitsprobe befindlichen Proteine und/oder Peptide.

Die Erfindung betrifft außerdem eine Vorrichtung zur qualitativen und/oder quantitativen Erfassung eines Protein- oder Peptidmusters einer Flüssigkeitsprobe, die dem menschlichen oder tierischen Körper entnommen worden ist.

Die Vorrichtung umfaßt ein Kapillarelektrophoresegerät, eine Ionisierungseinheit, ein über ein Interface online gekoppeltes Massenspektrometer und eine Rechneinheit mit einem Programm zur Steuerung der Vorrichtung sowie zur automatischen Auswertung und Speicherung der Meßwerte sowie zur Abgleichung neuer Meßwerte mit den bereits gespeicherten Meßwerten.

Eine solche Vorrichtung ermöglicht die zuverlässige Bestimmung der Proteine und/oder Peptide in einer komplexen Matrix.

Das Kapillarelektrophoresegerät verfügt deshalb zum einen über eine hohe Trennleistung, die die Bestimmung eines vollständigen Protein- und/oder Peptidmusters der Flüssigkeitsprobe ermöglicht, und zum anderen über kurze Analysenzeiten, die es erlauben, zeitnahe Aussagen über den Zustand des menschlichen oder tierischen Körper, dem die Flüssigkeitsprobe entnommen worden ist, zu machen.

- 12 -

Für die qualitative und/oder quantitative Bestimmung der Proteine und/oder Peptide ist das Kapillarelektrophoresegerät an ein Massenspektrometer gekoppelt, das die mittels Kapillarelektrophorese getrennten Proteine und/oder Peptide detektiert.

Die Rechneinheit enthält ein Programm zur Steuerung der Vorrichtung. Außerdem werden die durch Detektion erhaltenen Meßwerte automatisch ausgewertet und abgespeichert. Weiterhin gleicht das Programm neue Meßwerte automatisch mit den bereits gespeicherten Meßwerten ab.

Durch den Abgleich werden übereinstimmende und abweichende Parameter ermittelt, die zur Beschreibung des Zustandes eines menschlichen oder tierischen Körpers herangezogen werden können.

Eine Weiterbildung sieht vor, daß das Programm die Peptid- oder Proteilmuster definierter Flüssigkeitsproben automatisch erfaßt und als Normalwerte in einer Referenzdatenbank speichert.

Dadurch ist es möglich, zunächst Protein- und/oder Peptidmuster von Flüssigkeitsproben menschlicher oder tierischer Körper zu bestimmen und als Referenzdaten abzuspeichern, bei denen der Zustand bekannt ist. Es wird eine umfangreiche Referenzdatenbank angelegt, die bei neuen Messungen automatisch zum Abgleich herangezogen werden kann.

- 13 -

Eine vorteilhafte Ausgestaltung der erfindungsgemäßen Vorrichtung sieht vor, daß das Programm die Peptid- oder Proteinmuster undefinierter Flüssigkeitsproben automatisch erfaßt, als Probenwerte in einer gesonderten Datenbank speichert, mit den Normalwerten der Referenzdatenbank abgleicht und Abweichungen und/oder Übereinstimmungen automatisch anzeigt und speichert.

Abweichungen oder Übereinstimmungen können als Parameter zur Beurteilung des Zustandes des menschlichen oder tierischen Körpers herangezogen werden.

Mittels der Datenbank ist es möglich, gleiche, ähnliche oder unterschiedliche Zustände des menschlichen oder tierischen Körpers zu identifizieren.

Außerdem ist es möglich, daß das Programm bei Bestimmungen aus mehreren in zeitlichen Abständen demselben menschlichen oder tierischen Körper entnommenen Flüssigkeitsproben die Veränderungen im Protein- und/oder Peptidmuster automatisch bestimmt, auswertet und speichert.

Damit wird die Kontrolle des Zustandes eines menschlichen oder tierischen Körpers über einen längeren Zeitraum sichergestellt.

Eine vorteilhafte Ausgestaltung sieht vor, daß das Programm automatisch eine Datenbank bestehend aus Zustände beschreibenden Referenzwerten, Probenwerten, Abweichungen und Übereinstimmungen erstellt und bei neuen Messungen automatisch

- 14 -

nach bestmöglichen Übereinstimmungen sucht. Dadurch ist es möglich, Zustände menschlicher oder tierischer Körper automatisch bestimmen zu lassen.

Außerdem ist vorgesehen, daß die Flüssigkeitsprobe Serum oder Urin ist.

Dies sind Flüssigkeitsproben, die dem menschlichen Körper entnommen werden, und über eine Protein- und/oder Peptidzusammensetzung verfügen, die besonders gut geeignet sind, Aussagen über den Zustand des menschlichen oder tierischen Körpers zu machen.

Eine Weiterbildung sieht vor, daß die Proteine und Peptide z. B. Cytokine, insbesondere Interleukine, sind.

Diese Proteine sind nach derzeitigem Wissen wichtige, die Funktionen des menschlichen und tierischen Organismus steuernden Proteine.

Es ist weiterhin möglich, daß das Massenspektrometer ein Flugzeitmassenspektrometer ist.

Flugzeitmassenspektrometer haben eine sehr hohe Scangeschwindigkeit und erreichen daher eine sehr gute Auflösung. Dadurch ist es möglich, die das Protein- und/oder Peptidmuster vollständig zu bestimmen.

Zwischen Kapillarelektrophoresegerät und Ionisierungseinheit kann außerdem ein Detektor angeordnet sein. Dieser dient in

- 15 -

Verbindung mit der Massenspektrometrie der besseren qualitativen und quantitativen Bestimmung des Protein- und/oder Peptidmusters.

Eine Weiterbildung sieht vor, daß die Ionisierungseinheit über Elektrospray-Ionisation verfügt.

Die Elektrospray-Ionisation ist auf Grund der relativ geringen auf die Moleküle wirkenden Energien eine milde Ionisierungstechnik, so daß selbst empfindliche Moleküle und teilweise sogar nichtkovalente Aggregate unzersetzt in den Massenanalysator gelangen. Dadurch wird eine sehr gute Identifizierung der in der Flüssigkeitsprobe gelösten Proteine und/oder Peptide ermöglicht.

Nachfolgend wird die Erfindung anhand eines Ausführungsbeispiels erläutert, das in der Zeichnung dargestellt ist. In dieser zeigen:

Fig. 1 eine schematische Darstellung des erfindungsgemäßen Verfahrens.

Fig. 1 zeigt schematisch die einzelnen Schritte zur qualitativen und/oder quantitativen Bestimmung eines Protein- und/oder Peptidmusters einer Flüssigkeitsprobe 10, die dem menschlichen oder tierischen Körper entnommen wurde.

Dargestellt ist die Flüssigkeitsprobe 10, vorzugsweise Serum oder Urin, die nach Ultrazentrifugation und Ultrafiltration erhaltenen Fraktionen 12, ein Kapillarelektrophoresegerät 14,

- 16 -

eine daran direkt angeschlossene Ionisierungseinheit 16, ein über ein Interface 18 online gekoppeltes Massenspektrometer 20 sowie eine Rechneinheit 22 mit einem Programm zur Steuerung der Vorrichtung sowie zur automatischen Auswertung und Speicherung der Meßwerte sowie zur Abgleichung neuer Meßwerte mit den bereits gespeicherten Meßwerten.

Die dem menschlichen oder tierischen Körper entnommene Flüssigkeitsprobe 10 wird zunächst mit Ameisensäure auf einen pH-Wert 3 angesäuert. Anschließend wird die Flüssigkeitsprobe 10 mittels Ultrazentrifugation von unerwünschten Partikeln gereinigt und mittels Ultrafiltration in Fraktionen 12, die Proteine und/oder Peptide bestimmter molekularer Größen enthalten, aufgeteilt. Die Fraktionen 12 können sich aus Proteinen und/oder Peptiden der Molekulargewichte <3 kDa, 3-30 kDa, 30-50 kDa und >50 kDa zusammensetzen.

Anschließend werden die Proteine und/oder Peptide der einzelnen Fraktionen 12 mittels Kapillarelektrophorese 14 getrennt, in einer Ionisierungseinheit 16 direkt ionisiert und online über ein Interface 18 in ein daran gekoppeltes Massenspektrometer 20 zur Detektion überführt.

Natürlich besteht die Möglichkeit nur die Fraktionen 12 zu verwenden, deren Proteine und/oder Peptide zur Beschreibung des Zustandes eines menschlichen oder tierischen Körpers gerade benötigt werden.

- 17 -

Bei dem Massenspektrometer 20 handelt es sich vorteilhaft um ein TOF-Massenspektrometer, das eine sehr hoher Scangeschwindigkeit besitzt und eine sehr gute Auflösung erreicht.

Das erhaltene Massenspektrums kann zum einen als eine Art "Fingerprint" zur Beschreibung des Gesamtzustandes eines menschlichen oder tierischen Körpers herangezogen werden. Zum anderen ist es aber auch möglich, die Proteine einzeln zu identifizieren und über ihre Anwesenheit, Nichtanwesenheit und ihre Konzentration Schlußfolgerungen über den Zustand des menschlichen oder tierischen Körpers zu ziehen.

Die Rechneinheit 22 enthält ein Programm zur Steuerung der Vorrichtung. Außerdem werden die durch Detektion erhaltenen Meßwerte automatisch ausgewertet und in Datenbanken abgespeichert. Weiterhin gleicht das Programm neue Meßwerte automatisch mit den bereits gespeicherten Meßwerten ab.

Durch den Abgleich werden übereinstimmende und abweichende Parameter ermittelt, die zur Beschreibung des Zustandes eines menschlichen oder tierischen Körpers herangezogen werden können.

Mittels der Datenbanken ist es möglich, gleiche, ähnliche oder unterschiedliche Zustände des menschlichen oder tierischen Körpers zu identifizieren.

Das erfindungsgemäße Verfahren zur qualitativen und/oder quantitativen Bestimmung eines Protein- und/oder Peptidmusters einer Flüssigkeitsprobe, die dem menschlichen oder tie-

- 18 -

rischen Körper entnommen wird, kann von technisch ausgebildeten Personen durchgeführt werden. Die Anwendung bedarf keines Arztes und kann auch außerhalb medizinischer Laboratorien angewendet werden.

P a t e n t a n s p r ü c h e

1. Verfahren zur qualitativen und/oder quantitativen Bestimmung eines Protein- und/oder Peptidmusters einer Flüssigkeitsprobe 10, die dem menschlichen oder tierischen Körper entnommen wird, dadurch gekennzeichnet, daß die Peptide und Proteine der Flüssigkeitsprobe 10 mittels Kapillarelektrophorese getrennt, anschließend direkt ionisiert und online über ein Interface 18 in ein daran gekoppeltes Massenspektrometer 20 zur Detektion überführt werden.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß als Flüssigkeitsprobe 10 Serum oder Urin verwendet wird.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß das Protein- und/oder Peptidmuster der Cytokine, insbesondere der Interleukine, bestimmt wird.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Flüssigkeitsprobe 10 vor ihrer Trennung mittels Kapillarelektrophorese zunächst angesäuert wird, mittels Ultrazentrifugation von unerwünschten Partikeln gereinigt und/oder mittels Ultrafiltration in Fraktionen 12, die Proteine und/oder Peptide bestimmter molekularer Größen enthalten, aufgeteilt wird.

5. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß sich die Fraktionen 12 aus Proteinen und/oder Peptiden der Molekulargewichte <3 kDa, 3-30 kDa, 30-50 kDa und >50 kDa zusammensetzen.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß zur Ionisation der Proteine und/oder Peptide die Elektrospray-Ionisation verwendet wird.
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß als Massenspektrometer 20 ein Flugzeitmassenspektrometer verwendet wird.
8. Vorrichtung zur qualitativen und/oder quantitativen Erfassung eines Protein- oder Peptidmusters einer Flüssigkeitsprobe 10, die dem menschlichen oder tierischen Körper entnommen worden ist, dadurch gekennzeichnet, daß die Vorrichtung ein Kapillarelektrophoresegerät 14, eine Ionisierungseinheit 16, ein über ein Interface 18 online gekoppeltes Massenspektrometer 20 und eine Rechneinheit 22 mit einem Programm zur Steuerung der Vorrichtung sowie zur automatischen Auswertung und Speicherung der Meßwerte und zur Abgleichung neuer Meßwerte mit den bereits gespeicherten Meßwerten enthält.
9. Vorrichtung nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß das Programm die Peptid- oder Proteinmuster definierter Flüssigkeitsproben 10 automatisch erfaßt und als Normalwerte in einer Referenzdatenbank speichert.

10. Vorrichtung nach Anspruch 8 oder 9, dadurch gekennzeichnet, daß das Programm die Peptid- oder Proteinmuster undefinierter Flüssigkeitsproben 10 automatisch erfaßt, als Probenwerte in einer Datenbank speichert, mit den Normalwerten der Referenzdatenbank abgleicht und Abweichungen und/oder Übereinstimmungen automatisch anzeigt.

11. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 8 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß das Programm bei Bestimmungen aus mehreren in zeitlichen Abständen dem menschlichen oder tierischen Körper entnommenen Flüssigkeitsproben 10 die Veränderungen im Protein- und/oder Peptidmuster automatisch bestimmt, speichert und auswertet.

12. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 8 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß das Programm automatisch eine Datenbank bestehend aus Zustände beschreibenden Referenzwerten, Probenwerten, Abweichungen und Übereinstimmungen erstellt und bei neuen Messungen automatisch nach bestmöglichen Übereinstimmungen sucht.

13. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 8 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß die Flüssigkeitsprobe 10 Serum oder Urin ist.

14. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 8 bis 13, dadurch gekennzeichnet, daß die Proteine und Peptide Cytokine, insbesondere Interleukine, sind.

15. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 8 bis 14, dadurch gekennzeichnet, daß das Massenspektrometer 20 ein Flugzeit-massenspektrometer ist.

16. Verfahren nach einem der Ansprüche 8 bis 15, dadurch gekennzeichnet, daß die Ionisierungseinheit 16 über Elektrospray-Ionisation verfügt.

1/1

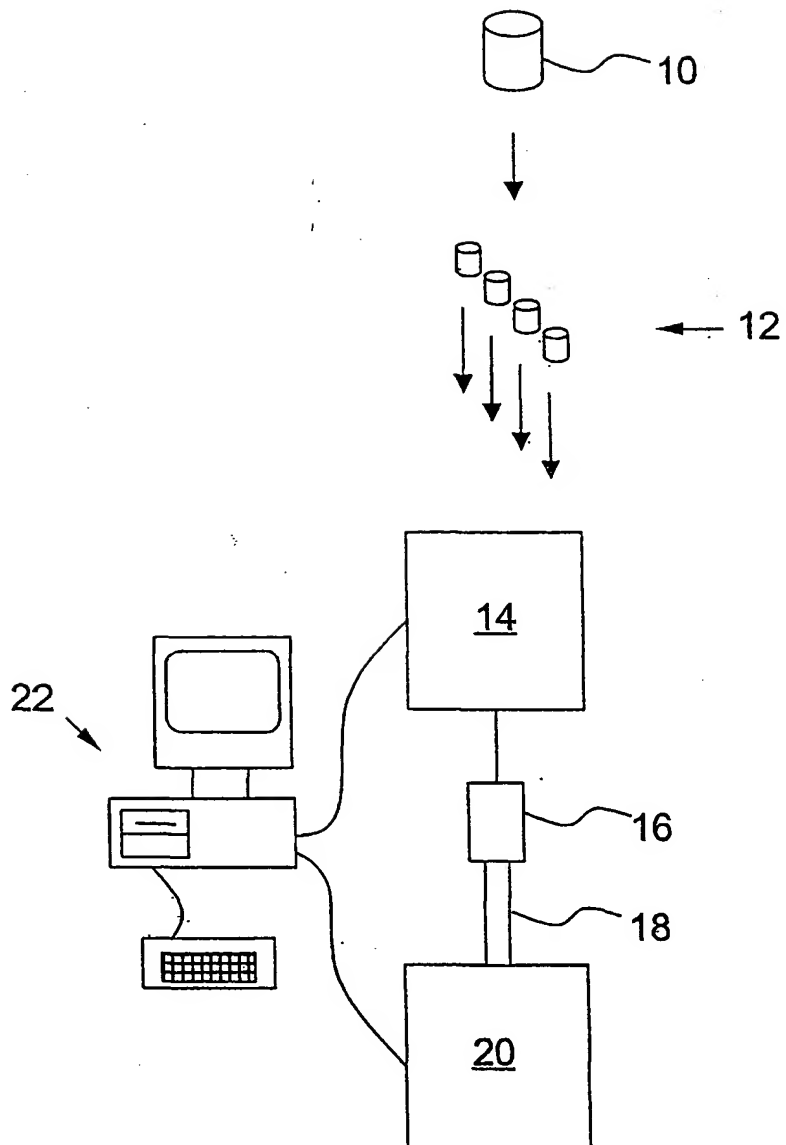


FIG. 1

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
8. November 2001 (08.11.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/84140 A3

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: G01N 27/447

6, 31319 Schnde OT Müllingen (DE). HALLER, Her-
mann [DE/DE]; An der Trift 8 a, 30559 Hannover (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE01/01691

(22) Internationales Anmeldedatum:
4. Mai 2001 (04.05.2001)

(74) Anwalt: THÖMEN & KÖRNER; Zeppelinstrasse 5,
30175 Hannover (DE).

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(81) Bestimmungsstaaten (*national*): JP, US.

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): europäisches Patent (AT,
BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC,
NL, PT, SE, TR).

(30) Angaben zur Priorität:
100 21 737.0 4. Mai 2000 (04.05.2000) DE

(71) Anmelder und

Veröffentlicht:

(72) Erfinder: MISCHAK, Harald [DE/DE]; Storchenstrasse

— mit internationalem Recherchenbericht

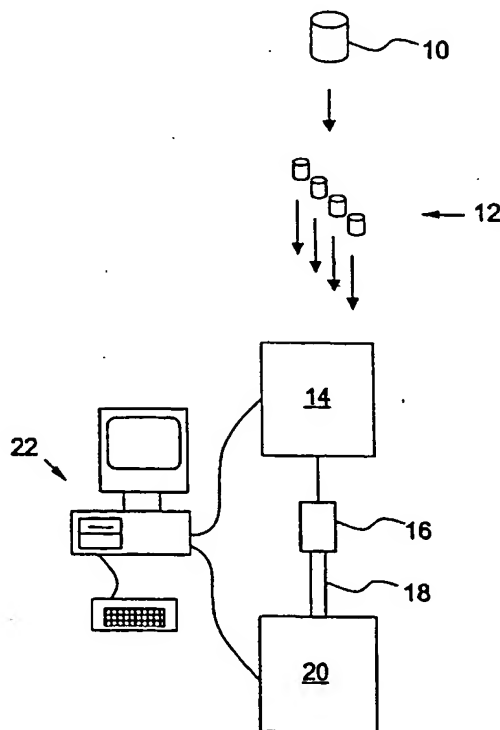
[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: METHOD AND DEVICE FOR THE QUALITATIVE AND/OR QUANTITATIVE ANALYSIS OF A PROTEIN
AND/OR PEPTIDE PATTERN OF A LIQUID SAMPLE THAT IS DERIVED FROM THE HUMAN OR ANIMAL BODY

(54) Bezeichnung: VERFAHREN UND VORRICHTUNG ZUR QUALITATIVEN UND/ODER QUANTITATIVEN BESTIM-
MUNG EINES PROTEIN- UND/ODER PEPTIDMUSTERS EINER FLÜSSIGKEITSPROBE, DIE DEM MENSCHLICHEN
ODER TIERISCHEN KÖRPER ENTNOMMEN WIRD

(57) Abstract: The invention relates to a method for the qualita-
tive and/or quantitative analysis of a protein and/or peptide pattern
of a liquid sample that is derived from the human or animal body.
The proteins and peptides of the liquid sample are separated by
capillary electrophoresis, then directly ionized and transferred for
analysis online via an interface to a mass spectrometer coupled
thereto.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft ein Verfahren
zur qualitativen und/oder quantitativen Bestimmung eines
Protein- und/oder Peptidmusters einer Flüssigkeitsprobe,
die dem menschlichen oder tierischen Körper entnommen
wird. Die Proteine und Peptide der Flüssigkeitsprobe werden
mittels Kapillarelektrophorese getrennt, anschließend direkt
ionisiert und online über ein Interface in ein daran gekoppeltes
Massenspektrometer zur Detektion überführt.



WO 01/84140 A3



— vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen

Recherchenberichts:

10. Mai 2002

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/DE 01/01691

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 G01N27/447

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 98 35226 A (MOINI MEHDI ;CAO PING (US); UNIV TEXAS (US)) 13 August 1998 (1998-08-13) page 1, line 10 - line 11 page 19, line 20 -page 20, line 26 ---	1,2,6-8, 13
A	LILING FANG ET AL: "ON-LINE TIME-OF-FLIGHT MASS SPECTROMETRIC ANALYSIS OF PEPTIDES SEPARATED BY CAPILLARY ELECTROPHORESIS" ANALYTICAL CHEMISTRY, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, COLUMBUS, US, vol. 66, no. 21, 1 November 1994 (1994-11-01), pages 3696-3701, XP000483806 ISSN: 0003-2700 page 3698, left-hand column, paragraph 1 --- -/-	8-12

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *G* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

27 February 2002

Date of mailing of the international search report

07/03/2002

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Duchatellier, M

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/DE 01/01691

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	FIGEYS D ET AL: "PROTEIN IDENTIFICATION BY CAPILLARY ZONE ELECTROPHORESIS/MICROELECTRO SPRAY IONIZATION-TANDEM MASS SPECTROMETRY AT THE SUBFEMTOMOLE LEVEL" ANALYTICAL CHEMISTRY, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, COLUMBUS, US, vol. 68, 1 June 1996 (1996-06-01), pages 1822-1828, XP002066085 ISSN: 0003-2700 page 1824, left-hand column, paragraph 3	8-12
A	WO 99 46047 A (ANDERSON NORMAN G ;ANDERSON N LEIGH (US); BIOSOURCE PROTEOMICS INC) 16 September 1999 (1999-09-16) abstract	4
A	WO 96 33410 A (BIOMETRIC IMAGING INC) 24 October 1996 (1996-10-24) claim 7	3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Inter. Patent Application No

PCT/DE 01/01691

Patent document cited in search report		Publication date		Patent family member(s)	Publication date
WO 9835226	A	13-08-1998	AU	6266998 A	26-08-1998
			WO	9835226 A1	13-08-1998
WO 9946047	A	16-09-1999	AU	3003099 A	27-09-1999
			EP	1062044 A2	27-12-2000
			WO	9946047 A2	16-09-1999
			US	6254834 B1	03-07-2001
			US	6340570 B1	22-01-2002
			US	6346421 B1	12-02-2002
WO 9633410	A	24-10-1996	US	5843680 A	01-12-1998
			AU	5553496 A	07-11-1996
			WO	9633410 A1	24-10-1996

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationale Aktenzeichen

PCT/DE 01/01691

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 G01N27/447

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 G01N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 98 35226 A (MOINI MEHDI ;CAO PING (US); UNIV TEXAS (US)) 13. August 1998 (1998-08-13) Seite 1, Zeile 10 - Zeile 11 Seite 19, Zeile 20 -Seite 20, Zeile 26 ---	1,2,6-8, 13
A	LILING FANG ET AL: "ON-LINE TIME-OF-FLIGHT MASS SPECTROMETRIC ANALYSIS OF PEPTIDES SEPARATED BY CAPILLARY ELECTROPHORESIS" ANALYTICAL CHEMISTRY, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, COLUMBUS, US, Bd. 66, Nr. 21, 1. November 1994 (1994-11-01), Seiten 3696-3701, XP000483806 ISSN: 0003-2700 Seite 3698, linke Spalte, Absatz 1 --- -/--	8-12



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

Z Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

27. Februar 2002

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

07/03/2002

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Duchatellier, M

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	FIGEYS D ET AL: "PROTEIN IDENTIFICATION BY CAPILLARY ZONE ELECTROPHORESIS/MICROELECTRO SPRAY IONIZATION-TANDEM MASS SPECTROMETRY AT THE SUBFEMTOMOLE LEVEL" ANALYTICAL CHEMISTRY, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, COLUMBUS, US, Bd. 68, 1. Juni 1996 (1996-06-01), Seiten 1822-1828, XP002066085 ISSN: 0003-2700 Seite 1824, linke Spalte, Absatz 3 -----	8-12
A	WO 99 46047 A (ANDERSON NORMAN G ;ANDERSON N LEIGH (US); BIOSOURCE PROTEOMICS INC) 16. September 1999 (1999-09-16) Zusammenfassung -----	4
A	WO 96 33410 A (BIOMETRIC IMAGING INC) 24. Oktober 1996 (1996-10-24) Anspruch 7 -----	3

INTERNATIONALES RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 01/01691

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9835226 A	13-08-1998	AU 6266998 A	26-08-1998
		WO 9835226 A1	13-08-1998
WO 9946047 A	16-09-1999	AU 3003099 A	27-09-1999
		EP 1062044 A2	27-12-2000
		WO 9946047 A2	16-09-1999
		US 6254834 B1	03-07-2001
		US 6340570 B1	22-01-2002
		US 6346421 B1	12-02-2002
WO 9633410 A	24-10-1996	US 5843680 A	01-12-1998
		AU 5553496 A	07-11-1996
		WO 9633410 A1	24-10-1996